



TITLE:

生体内分解高分子ポリマーと骨髄細胞とを組み合わせた小腸の機能再建法(小腸移植法)の開発

AUTHOR(S):

仲瀬, 裕志

CITATION:

仲瀬, 裕志. 生体内分解高分子ポリマーと骨髄細胞とを組み合わせた小腸の機能再建法(小腸移植法)の開発. 2006

ISSUE DATE:

2006-05

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/84664>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

生体内分解高分子ポリマーと骨髄細胞を組み合わせた
小腸の機能再建法(小腸移植法)の開発

(課題番号 : 16590590)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金

基盤研究(C) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 仲瀬 裕志
(京都大学医学研究科 講師)

京 都 大 学 図 書



1060667969

附 属 図 書 館

生体内分解高分子ポリマーと骨髄細胞を組み合わせた
小腸の機能再建法(小腸移植法)の開発

(課題番号 : 16590590)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金

基盤研究(C) 研究成果報告書

平成 18 年 4 月

研究代表者 仲瀬 裕志
(京都大学医学研究科 講師)

は し が き

本報告書は、平成 16 年度～平成 17 年度の科学研究費補助金により得られた研究成果を報告するものである。

研究組織

研究代表者：仲瀬 裕志（京都大学 医学研究科 講師）

研究分担者：田畑 泰彦（京都大学 再生医科学研究所 教授）

交付決定額(配分額)

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成16年度	2,700,000	0	2,700,000
平成17年度	1,000,000	0	1,000,000
総 計	3,700,000	0	3,700,000

背景と目的

クローン病や潰瘍性大腸炎などの難治性炎症性腸疾患は、近年わが国において増加の一途をたどっている。しかしながら、これらの疾患の原因は未だに不明である。一方、その治療方法に関しては、現在、ステロイドや免疫抑制剤などが主体となっている。しかしながら、薬物治療抵抗性の患者においては、小腸および大腸の狭窄が生じ、治療方法として腸管切除を余儀なくされる場合が少なくない。その結果、術後、短腸症候群をきたし、小腸および大腸の機能と栄養素の消化吸収が著しく障害されることが生じる。これらの患者に対しては、高カロリー輸液が広く普及したものの、継続困難な症例は少なからずあり、現在これらの患者の残された唯一の治療方法は小腸移植しかない。本研究では、組織工学的手法により、生体内分解吸収可能でかつ増殖因子の徐放が可能な小腸再生の足場となる再生チューブを作成する。さらに、このチューブに自己の骨髄細胞を移植することにより、生体内での小腸の構造および機能再建を目指す。

研究方法

小腸再生の足場としての支持組織の作製: 小腸の粘膜細胞は付着型の細胞であり、その支持組織としての足場(間質)が必要である。今回我々は、人工高分子であるポリグリコール酸(PGA)およびポリ乳酸(PDLLA)を用いてマウスラット小腸径と同様のチューブを作成する。さらに上皮再生に重要とされるFGFR3に強固に結合する増殖因子のbFGF 発現プラスミドを使用する。生分解性ゼラチンにbFGF 発現プラスミドを含有させたゼラチン-遺伝子複合体を作製し、これらの複合体でPGA チューブの外面を覆うことにより、チューブ内腔へのbFGF 徐放を可能とする。

骨髄細胞の分離、採取: レイスラット(20~25g)の大腿骨、および頸骨より骨髄細胞を採取する。これらの細胞を採取後、抗 T 細胞抗体およびウサギ血清を用いて T 細胞の除去を行う。

細胞接種および移植: 分離された $5 \times 10^6 \sim 10^7$ の骨髄細胞をPGA ポリマーチューブに接種し、培養液中にて、1時間培養後、骨髄細胞含有ポリマーチューブをレイスラットに移植する。

新生小腸における免疫担当細胞の機能評価: 新生小腸を取り出し、小腸粘膜固有層、上皮間よりリンパ球を抽出し、フローサイトメトリーを用いてCD4、CD8細胞の比率を正常小腸のそれと比較検討する。

骨髄細胞の新生小腸における分布および役割: GFPラットの大腿骨、および頸骨より骨髄細胞を採取し、これらの細胞から上記と同様に T 細胞除去を行ったあと、PGA ポリマーチューブに接種、培養後、GFP 骨髄細胞含有ポリマーチューブをレイスラットに移植する。移植3ヶ月後、小腸、大腸、および腸間膜リンパ節、脾臓を取り出し、共焦点レーザー顕微鏡、または抗 GFP 抗体による染色で移植された細胞が存在するか否かを検討する。

結果

(1) 小腸再生チューブの作製: 人工高分子であるポリグリコール酸およびポリ乳酸を用いた小腸移植に適応した人工チューブはすでに完成した。また、われわれは今回bFGF がきわめて腸管上皮の再生に有用であることを証明した (Matsuura et al Gastroenterology 2005)。この結果から、bFGF を小腸再生に応用することが重要と考え、bFGF が徐放可能となるような生体内分解性ゼラチンの作製を試み、これについてもすでに完成しえた。このbFGF 徐放可能な生体内分解性ゼラチンを上記チューブに貼り付け、採取された骨髄細胞をそのチューブに接種し、小腸切除後のラットに移植した。移植後2ヵ月および3ヶ月後のチューブ内には小腸上皮と考えられる粘膜が再生していることを我々は確認しえた。

(2) 現在、再生された小腸粘膜に対して組織学的評価および機能評価をおこなっている。また、超細経の内視鏡からの観察では再生開始時より絨毛上皮は比較的早期から観察されることが証明された。またこの内視鏡による経時的な観察結果より、再生が進むにつれて絨毛内の血管密度がまず増強し、その後絨毛密度の上昇および肥大が確認された。

(3) 小腸再生上皮内の免疫担当細胞に関しては、現時点ではT細胞(CD4およびCD8細胞)、B細胞などの比率は正常小腸上皮内と比べても有意な差は認められなかった。

(4) GFPラットからの骨髄細胞の採取およびこの細胞を用いた移植は成功した。(1)で記載した再生チューブに GFP ラットから採取された骨髄細胞をチューブに接種後、同様の移植処置を施行した結果、移植された骨髄細胞の分布状態、および分化しうる細胞についての検討では、移植された骨髄細胞は間質細胞および上皮細胞に分化しうることを示唆された。

考 察

我々が今回開発した骨髄細胞移植小腸再生チューブにより、チューブ内への小腸再生が確認された。さらに、移植された骨髄細胞は間質細胞および上皮細胞に分化しうることを示唆された。これらの結果は、われわれの作成した新たな再生チューブにより生体内での小腸の構造および機能再建が可能となり、しいては小腸移植を必要とする短腸症候群患者に対する新たな治療法の開発に大きく貢献するものと考えられた。

研究発表

論文発表

1. Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Chiba T, Okazaki K. Specific Antibodies Against Recombinant Protein of Insertion element 900 of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn's Disease. Inflamm Bowel Disease 2006;12:62-69.
2. Uza N, Nakase H, Nishimura K, Yoshida S, Kawabata K, Chiba T. Solitary rectal ulcer syndrome with ulcerative colitis. Gastrointest Endosc 2006 ;63:355-6
3. Ohashi S, Nishio A, Nakamura H, Kido M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kiriya K, Asada M, Tamaki H, Matsuura M, Kawasaki K, Fukui T, Watanabe N, Nakase H, Yodoi J, Okazaki K, Chiba T. Protective roles of redox-active protein thioredoxin-1 for severe acute pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006;290:G772-G781
4. Fukui T, Nishio A, Okazaki K, Uza N, Ueno S, Kido M, Inoue S, Kitamura H, Kiriya K, Ohashi S, Asada M, Tamaki H, Matsuura M, Kawasaki K, Suzuki K, Uchida K, Fukui H, Nakase H, Watanabe N, Chiba T. Gastric mucosal hyperplasia via up-regulation of gastrin induced by persistent activation of gastric innate immunity in MHC class II-deficient mice. Gut 2006;55:607-15
5. Nakase N, Matsuura M, Uza N, Ueno S, Nishio A, Chiba T. Rectal Carcinoid Tumor Mimicking Colonic Adenomatous Lesion. Gastrointest Endosc 2005; 62:976-977.
6. Uza N, Nakase H, Chiba T. Image of the Month: Meckel's diverticulum with an enterolith. Gastroenterology 2006 (in press)

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし